

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-155577

(43)公開日 平成11年(1999)6月15日

(51)Int.Cl.⁶
C 1 2 N 15/09
1/21
9/04
C 1 2 P 23/00
// (C 1 2 N 15/09
ZNA

識別記号
ZNA
F I
C 1 2 N 15/00
1/21
9/04
C 1 2 P 23/00
Z

審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号 特願平9-331936
(22)出願日 平成9年(1997)12月2日

(71)出願人 591025303
農林水産省果樹試験場長
茨城県つくば市藤本2-1
(71)出願人 000195568
生物系特定産業技術研究推進機構
埼玉県大宮市日進町1丁目40番地2
(72)発明者 矢野 昌充
静岡県清水市興津本町318果樹試験所
(72)発明者 大村 三男
静岡県静岡市小鹿3-4-5 合同宿舎小
鹿住宅8-36
(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に統ぐ

(54)【発明の名称】 β -カロテンハイドロキシラーゼ遺伝子

(57)【要約】

【課題】 β -カロテンハイドロキシラーゼ、該酵素をコードするDNAの提供。

【解決手段】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質及び該タンパク質をコードするDNA。

(a)配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項3】 配列番号1で表わされる塩基配列を含む、請求項2記載のDNA。

【請求項4】 請求項2又は3記載のDNAを含む組換えベクター。

【請求項5】 請求項4記載の組換えベクターによって形質転換された形質転換体。

【請求項6】 請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から β -カロテンハイドロキシラーゼを採取することを特徴とする β -カロテンハイドロキシラーゼの製造方法。

【請求項7】 請求項5記載の形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から β -クリプトキサンチンを抽出することを特徴とする β -クリプトキサンチンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、 β -カロテンハイドロキシラーゼ、 β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNA、該DNAを含む組換えベクター、該ベクターによって形質転換された形質転換体並びに β -カロテンハイドロキシラーゼ及び β -クリプトキサンチンの製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】動植物や微生物が生成するカロテノイド類の中には、水酸基を有するいわゆるキサントフィルと称される一群の化合物が存在する。これらは出発物質のカロテノイドからハイドロキシラーゼ(hydroxylase)の触媒作用によって、以下の生合成経路により β -カロテンに水酸基が1個導入されて β -クリプトキサンチンが、さらに1個水酸基が導入されてゼアキサンチンが生成する(図1、(1)の矢印)。

β -カロテン → β -クリプトキサンチン → ゼアキサンチン

すなわち、この β -クリプトキサンチンは、 β -カロテンに存在する2つのイオノン環の片方に水酸基が導入されたものであり、さらに対称の位置に水酸基が導入されるとゼアキサンチンとなる(図1)。

【0003】多くの植物や微生物では、 β -カロテンからゼアキサンチンへ代謝が進行するため、代謝経路の中間物質であって水酸基が1個のみ導入された β -クリプトキサンチンはほとんど生成されない。この反応はCrtZと呼ばれるハイドロキシラーゼ遺伝子が制御し、その

酵素反応では2個の水酸基がほぼ同時に導入されると考えられている。例えば、エルビニア菌からクローニングされた遺伝子では β -カロテンに水酸基が2個導入されたゼアキサンチンが生成される。ところで、我が国の主要カンキツ系果物であるウンシュウミカンでは、 β -カロテンに水酸基が1個導入された β -クリプトキサンチンは、最も重要なカロテノイドの一つであると考えられ、特に可食部において全カロテノイドの60~70%を占めている。

【0004】このようなウンシュウミカンの β -クリプトキサンチンの含有量を考慮すると、ウンシュウミカンの β -クリプトキサンチンは、これまでにクローニングされた前記代謝経路に関する遺伝子により生成されているとは考えにくい。また、既にクローニングされた遺伝子によって β -クリプトキサンチンが生成されるか否かについては未だ不明である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、 β -カロテンハイドロキシラーゼ及び当該酵素をコードする遺伝子を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するため銳意研究を行った結果、カンキツ由来cDNAライブラリーより β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAを単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、以下の(a)又は(b)の組換えタンパク質である。

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1

若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質

さらに、本発明は、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAである。

【0007】(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有するタンパク質

50

さらに、本発明は、配列番号1で表わされる塩基配列を含む、 β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAである。さらに、本発明は、前記DNAを含む組換えベクターである。さらに、本発明は、前記組換えベクターによって形質転換された形質転換体である。

【0008】さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から β -カロテンハイドロキシラーゼを採取することを特徴とする β -カロテンハイドロキシラーゼの製造方法である。さらに、本発明は、前記形質転換体を培地に培養し、得られる培養物から β -クリプトキサンチンを抽出することを特徴とする β -クリプトキサンチンの製造方法である。以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明は、図1の(2)の矢印の反応を触媒する β -カロテンハイドロキシラーゼ及び当該 β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAに関するものである。本発明のcDNAは、まず、バクテリア由来の β -カロテンハイドロキシラーゼをコードする遺伝子の保存領域を基にしてプライマーを作製し、カンキツ(宮川早生温州)果実(砂じょう)及び花由来first-strand cDNAを錆型として3' RACE RT-PCRを行ってウンシュウミカン β -カロテンハイドロキシラーゼcDNAを得、続いて当該cDNAをプローブとして用いてウンシュウミカン可食部由来cDNAライブラリーより単離することができる。

【0010】1. β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNAのクローニング

(1) プライマーの作製

まず、後述の3' RACE RT-PCRを行うためのプライマーを作製する。目的のDNAに対してより特異性の高いプライマーを作製するためには、各細菌と植物との間でアミノ酸残基の保存性の高い領域をコードするオリゴヌクレオチドを作製するのが適当である。なお、プライマーは、通常の化学合成により得ることができる。この条件に合うものとして、例えば以下の保存アミノ酸配列を選択する。

- i) 「Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala」(配列番号3)
- ii) 「His Asp Gly Leu Val His」配列(配列番号4)

【0011】ここに示したアミノ残基における保存性の高い2つの領域は互いに近傍に位置することから、それぞれの保存領域をセンスプライマー及びアンチセンスプライマーとして用いてPCRを行うことができない。そこで、本発明では、それぞれの配列をいずれもセンスプライマーとして用いる3' RACE RT-PCR法を採用することにした。ここで上記配列は、文献: Zairen Sun et.al. The Journal of Biological Chemistry. 1996; Vol.271, no.40; 24349-2435およびNakaqawa M. and N. MisawaAgric. Biol. Chem 55:2147-2148に記載されたアラビドブシスおよびErwinia由來 β -カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列内の領域である。これらのアミノ酸配

列を基にして、例えば以下の配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーを作製する。但し、プライマーはこれらの配列に限定されるものではない。

センス1プライマー(Bech-a) : TT(t/c)CA(g/a)CTAAA(c/t)GA(t/c)GTN(配列番号5)

センス2プライマー(Bech-b) : CACGA(c/t)GGTCTNGTNCA(配列番号6)

【0012】(2) 3' RACE RT-PCR

次に、合成した2つのセンスプライマーを用いて3' RAC

- 10 E RT-PCRを行う。RT-PCR(reverse transcription-PCR法)とは、逆転写酵素を用いてRNAを錆型としたDNAの合成反応(逆転写)をあらかじめ行い、その合成されたDNAをあらためて錆型としてPCRを行う方法である。また、3' RACE(Rapid Amplification of cDNA ends)とは、既知領域の塩基配列情報をもとにRT-PCRを行って、cDNA末端までの未知領域をクローニングする方法である。まず、5'末端にアダプター配列の付いたオリゴ(dT)をプライマーにして逆転写反応を行い、第一鎖cDNA(first-strand cDNA)を合成する。得られたfirst-strand cDNAは、20 全てアダプター配列が末端に付いた構造をしている。このため、クローニングを目的とするcDNAは、未知領域が既知配列とアダプター配列に挟まれた形になる。そこで、既知配列の一部をセンスプライマーとして、アダプタープライマーとともにPCRを行うことによって、両者に挟まれた未知領域(cDNA部分配列)を増幅することができる。なおRT-PCRは、市販のキット(T-Primed First-Strand Kit: Pharmacia)を用いて行うことができる。

【0013】(3) cDNAライブラリーの作製

- 30 前記のようにして得られたcDNA部分配列をプローブとして果実由来cDNAライブラリーから目的とするcDNA全長配列を得るため、そのライブラリーの作製を以下のように行う。カンキツ各器官又は組織(果実、葉、根、花、カルス等)からグアニジン試薬又はSDS-フェノール等を用いて全RNAを単離し、オリゴdT-セルロース又はセファロース2Bを担体とするポリI-セファロース等を用いたアフィニティーカラム法により、あるいはオリゴテックス樹脂を用いる方法によりmRNAを調製する。得られたmRNAを錆型として、逆転写酵素を用いて一本鎖cDNAを合成した後、この一本鎖から二本鎖cDNAを合成する。この二本鎖cDNAを適当なプラスミド又はファージベクターにリガーゼを用いて連結し、組換え体DNAを得る。組換え体DNAを用いて大腸菌等に感染または形質転換することにより、ブラークやコロニーによりスクリーニングが可能なcDNAライブラリーを得ることができる。

【0014】(4) cDNAライブラリーからの β -カロテンハイドロキシラーゼcDNAホモログの単離

- 続いて、上述した3' RACE RT-PCRにより単離された配列をプローブに用いて、ブラークハイブリダイゼーションやコロニーハイブリダイゼーションにより全長cDNA配列

をスクリーニングする。ハイブリダイゼーションは、例えば市販のキット(ECL nucleic acid labelling and detection system (Amersham))等を使用することができます。

【0015】(5)塩基配列の決定

得られたクローンについて塩基配列の決定を行う。塩基配列の決定はマキサム-ギルバート法、ジデオキシン法等の公知手法により行うことができるが、通常は自動塩基配列決定装置を用いて配列決定が行われる。配列番号1に本発明のDNAの塩基配列を、配列番号2に本発明の β -カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列を示すが、このアミノ酸配列からなるタンパク質が β -カロテンハイドロキシラーゼ活性を有する限り、当該アミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号2で表わされるアミノ酸配列の第1番目のMetが消失したものなども、本発明のタンパク質に含まれる。ここで、本発明における β -カロテンハイドロキシラーゼ活性とは、 β -カロテンから β -クリプトキサンチンを生成する触媒反応を担う活性を意味する。一旦本発明のDNAの塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、あるいは当該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明のDNAを得ることができます。

【0016】2. 組換えベクター及び形質転換体の作製

(1) 組換えベクターの作製

本発明の組換えベクターは、適当なベクターに本発明のDNAを連結(挿入)することにより得ることができる。本発明のDNAを挿入するためのベクターは、宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、プラスミドDNA、ファージDNA等が挙げられる。プラスミドDNAは、大腸菌やアグロバクテリウムからアルカリ抽出法(Birnboim,H.C. & Doly,J.(1979) Nucleic acid Res 7: 1513)又はその変法等により調製することができる。また、市販のプラスミドとして、例えばpBluescript II SK+(Stratagene社製)、pUC118(宝酒造社製)、pUC119(宝酒造社製)、pGEM-T(Promega社製)等を用いてよい。これらのプラスミドは、アンビシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が含まれていることが好ましい。ファージDNAとしては、例えばM13mp18、M13mp19等が挙げられる。ベクターに本発明のDNAを挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクターDNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターに連結する方法などが採用される。本発明のDNAは、そのDNAの機能が發揮されるようにベクターに組み込まれることが必要である。そこで、本発明のベクターには、プロモーター、本発明のDNAのほか、ターミネーター、リボソーム結合配列等を組み込んでもよい。

【0017】(2)形質転換体の作製

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、目的遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、本発明のDNAを発現できるものであれば特に限定されるものではない。例えば、大腸菌(Escherichia coli)、バチルス・ズブチリス(Bacillus subtilis)等のエッシャリヒア属、バチルス属に属する細菌、サッカロミセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)等の酵母、あるいはCOS細胞、CHO細胞等の動物細胞等が挙げられる。大腸菌等の細菌を宿主とする場合は、本発明の組換えベクターが該宿主中で自律複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNA、転写終結配列により構成されていることが好ましい。また、プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

【0018】発現ベクターとしては、例えばpBluescript IIベクター、pETベクター(Stratagene社製)等が用いられる。プロモーターとしては、大腸菌等の宿主中で発現できるものであればいずれを用いてもよい。例えばtrpプロモーター、lacプロモーター、P_cプロモーター、P_eプロモーターなどの、大腸菌やファージに由来するプロモーターが用いられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されない。例えばカルシウムイオンを用いる方法(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110-2114(1972))等が挙げられる。酵母を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばYEp13、YEp24、YCP50等が用いられる。この場合のプロモーターとしては、酵母中で発現できるものであれば特に限定されず、例えばqal1プロモーター、qal10プロモーター、ヒートショックタンパク質プロモーター、MFα1プロモーター等が挙げられる。

【0019】酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法(Methods. Enzymol., 194, 182-187(1990))、スフェロプラスト法(Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 1929-1933(1978)、酢酸リチウム法(J. Bacteriol., 153, 163-168(1983))等が挙げられる。動物細胞を宿主として用いる場合は、発現ベクターとして例えばpcDNA1/Amp (Invitrogen社)等が用いられる。この場合、プロモーターとしてヒトサイトメガロウ

イルスの初期遺伝子プロモーター等を用いてもよい。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リボフェクション法等が挙げられる。なお、本発明の組換えベクターは、大腸菌に導入され(名称: EpCitBECH1)、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、FERM BP-6188としてプラベスト条約に基づき国際寄託されている。

【0020】3. β -カロテンハイドロキシラーゼの生産

50 本発明の β -カロテンハイドロキシラーゼは、前記形質

転換体を培地に培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養効率的に行える培地であれば、天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

【0021】炭素源としては、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパンオール等のアルコール類が用いられる。窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンスティーブリカ等が用いられる。無機物としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等が用いられる。

【0022】培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好気的条件下、28°Cで48~60時間行う。培養期間中、pHは7.0~7.5に保持する。pHの調整は、無機又は有機の酸、アルカリ溶液等を用いて行う。なお、大腸菌を宿主として培養を行う場合は、大腸菌内にpACCAR16△crtXプラスミド（ファルネシリニリン酸からβ-カロテンまでが生成できる、4つのエルビニア(*Erwinia*)属に属する微生物由来の遺伝子を持つ）と共存させて培養を行うことが好ましい。培養中は必要に応じてアンビシリソやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0023】プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養する場合は、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、Lacプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)等を、trpプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸(IAA)等を培地に添加してもよい。動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37°Cで1~2日行う。培養中は必要に応じてカナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

【0024】培養後、本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼが菌体内又は細胞内に生産される場合には菌体又は細胞を破碎等することによりβ-カロテンハイドロキシラーゼを採取する。また、本発明のβ-カロテンハ

イドロキシラーゼが菌体外又は細胞外に生産される場合には培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去した後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えは硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせて用いることにより、培養物中から本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼを単離精製することができる。最終的に得られたタンパク質がβ-

10 カロテンハイドロキシラーゼであることの確認は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動等により行うことができる。

【0025】4. β-クリプトキサンチンの生産

本発明では、β-カロテンハイドロキシラーゼを精製した手法と同様にしてβ-クリプトキサンチンを生産することもできる。すなわち、前記形質転換体を培地に培養し、その培養物からβ-クリプトキサンチンを抽出するものである。培養方法については、前記「3. β-カロテンハイドロキシラーゼの生産」の項に記載の方法と同様である。培養後、遠心分離等により菌体又は細胞を除去した後、例えはHPLC等を用いることにより、培養物中からβ-クリプトキサンチンを抽出することができる。最終的に抽出された物質がβ-クリプトキサンチンであることの確認は、¹H-NMR、紫外-可視スペクトル、質量分析法等により行うことができる。

【0026】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。ただし、本発明は、これら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

30 【実施例1】β-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNAのクローニング

(1) 3'RACE RT-PCR法を用いた目的部分cDNAのクローニング

まずプライマーとしてNotI-d(T)₁₀(5'd[AACTCGAACATTCCGGCCGCAGGAAT₁₀]'-3')（配列番号7）を用い、カンキツ（宮川早生温州）果実(砂じょう)および花由来RNAを鋳型として逆転写反応を行い、1st-strand cDNAを作製した。なお、全ての1st-strand cDNA断片の3'末端には合成時にNotIアダプター配列(TCGAAGAATTCCGGGCCCA

40 G; 配列番号8）を付加した構造にしてある。この1st-strand cDNAを鋳型にセンス1プライマーとアダプタープライマーを用いて3'-RACE法を行う。PCRは、94.5°Cで40秒(変性)及び60°Cで2分(アニール/伸長)の反応を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。しかしこの第一段階のPCRでは、用いた2つのプライマーのうち一方のアダプタープライマーは逆転写反応によって生成された全cDNAに共通に含まれる配列となる。したがってこの段階で得られるPCR産物は、非特異的に増幅されるDNAが多く含まれる。そこで、目的のDNAを特異的に増幅するため、センス2プライマーを用いて第2段階のPCRを行

った。第2段階のPCRは、94.5°Cで35秒(変性)、55°Cで45秒(アニール)及び72°Cで1分(伸長)の反応を1サイクルとしてこれを35サイクル行った。なお、RT-PCRは市販のキット(T-Primed First-Strand Kit: Pharmacia)を用いて行った。以上のようにして、カンキツβ-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNA部分配列を得た。

【0027】(2) カンキツ果実組織由来cDNAライブラリーの作製

宮川早生温州の果実(砂じょう組織)から、グアニジンチオシアネットを用いて全RNAを単離した。単離された全RNAからOligotex-dT30[Super](TaKaRa)を用いてmRNAに精製後、oligo(dt)₁₂₋₁₈プライマーと Moloney Murine Leukemia Virus(MMLV)由來の逆転写酵素によって、first-strand cDNAを合成し、さらにDNAポリメラーゼによって第二鎖(second-strand)が合成された(Pharmacia)。この2本鎖cDNAをEcoRIアダプターをT4-DNAリガーゼによって付加し、Uni-ZAP EcoRI ファージミドベクター(STRATAGENE)へのライゲーションを行った。

【0028】(3) ブラーカハイブリダイゼーションによる目的全長cDNAのスクリーニング

続いて、上述した3' RACE RT-PCRにより単離されたカンキツβ-カロテンハイドロキシラーゼをコードするcDNA部分配列をプローブとして、ブラーカハイブリダイゼーションにより全長cDNA配列をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは市販のキット(ECL nucleic acid labelling and detection system(Amersham))を使用した。スクリーニング(3x10⁴ pfc)の結果、推定分子量34.7kDa、311残基のアミノ酸をコードする全長1158bpのβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAホモログを単離した。このクローンは、アラビドブシスから単離されているβ-カロテンからゼアキサンチンを生成するβ-カロテンハイドロキシラーゼcDNAと76.3%の相同性を示し、バクテリア由來のゼアキサンチンを生成するβ-カロテンハイドロキシラーゼ遺伝子とは、35.7%~39.8%の相同性を示した。このクローンを「CitBECH1」と命名した。CitBECH1の塩基配列は、配列番号1で示し、またCitBECH1によりコードされるアミノ酸配列は、配列番号2で示した。

【0029】なお、従来のβ-カロテンハイドロキシラーゼと本発明のβ-カロテンハイドロキシラーゼとの間におけるホモジーを比較した結果を図3に示す。図3において、最上部(CitBECH1)が本発明の遺伝子によりコードされるβ-カロテンハイドロキシラーゼのアミノ酸配列である。その他は類縁の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列であり、いずれもβ-カロテンからβ-クリプトキサンチンを通り越してゼアキサンチンを生成する酵素のアミノ酸配列である。

【0030】〔実施例2〕 β-カロテンハイドロキシラーゼを有する大腸菌でのβ-クリプトキサンチンの生産

10 単離したクローンをアンビシリン耐性遺伝子を有するpBluescript II SK+プラスミドに挿入後、大腸菌内でpACCAR16Δ crtXプラスミド(ファルネシルニリン酸からβ-カロテンまでが生成できる、4つの由来の遺伝子を持つ)と共に存させて培養を行った。培養は、LB培地に大腸菌をまき、28°Cで60時間培養を行った。次に、培養物についてアセトン抽出を行った。この形質転換体からのアセトン抽出液についてHPLC(システム:日本分光)を行った。HPLCは、カラムとしてYMC製C30を用い、溶離A液としてメタノール/メチル-t-ブチルエーテル/水を8/1/15/4の比で混合したものを、溶離B液としてメタノール/メチル-t-ブチルエーテルを10/90の比で混合したものを使用した。また、グラジェント条件は、スタート時はA液100%、70分後はA液20%及びB液80%とし、流速は1.0ml、カラム温度は22°C、検出波長は450nmで分析した。

【0031】その結果、図2に示すクロマトグラムが得られた。得られたピークをフナコシ製のカロテノイド標準品と対比したところ、本大腸菌の生成したカロテノイドの比率はβ-クリプトキサンチン、β-カロテン、ゼアキサンチンが43:22:11であった。この結果から、カンキツ由来β-カロテンハイドロキシラーゼは主にβ-クリプトキサンチンを生成すると判断した。

【0032】(2) β-クリプトキサンチンの精製及び同定

プラスミドpCitBECH 1をβ-カロテン产生大腸菌JM101に導入したもの(大腸菌(PACCAR16Δ crtX, pCitBECH 1)) (黄色を呈している)を、150μg/mlのアンビシリン(Ap)及び30μg/mlのクロラムフェニコール(Cm)を含む2XYT培地(1.6%トリプトン、1%イーストエキス、0.5%NaCl)1.6リットル中、30°Cで28時間培養した。培養液から集菌した菌体を360mlのアセトンにより抽出した。これを濃縮後、200mlのクロロホルム/メタノール(9/1)で2回抽出し、濃縮乾固した。さらにこれを少量のクロロホルム/メタノール(9/1)に溶解した後、メルク社製の分取用シリカゲルTLCプレートを用いて、クロロホルム/メタノールで展開することにより、薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。

【0033】その結果、元の色素は、このTLCにより頂点のβ-カロテンのスポット以外にRf値0.4(濃い)及び0.1(非常に薄い)の2つのスポットに分かれた。そこで、濃い黄色色素であるRf 0.4の色素をTLCプレートからかきとった後、少量のクロロホルム/メタノール(1/1)に溶解し、TOYOPEARL HW-40カラムクロマトグラフィーで展開溶出することにより、純品を1mg得た。本色素は、紫外-可視スペクトル(λ 425, 448, 475nm、メタノール中)、FD-MSスペクトル(m/e 553, [M]⁺)の結果よりβ-クリプトキサンチンであると考えられた。さらに、¹H-NMRスペクトルにより、3-ヒドロキシ

11

- β -イオノン環及び β -イオノン環の2つのシグナル
(G. Englert, N.M.R. of carotenoids, Edited by G. Britton, T.W.Goodwin, Carotenoid Chemistry and Biochemistry) が確認された。

【0034】従って、本色素を β -クリプトキサンチンであると同定した(図2)。図2は、本発明の遺伝子の β -クリプトキサンチン生合成への関与を示している。図2において、上段の図はエルビニア菌の β -カロテン生合成系遺伝子を組み込んだ大腸菌から生成されたカロテノイドを、中段の図は上記大腸菌に本発明の遺伝子を組み込んで生成させたカロテノイドを、そして下段の図はゼアキサンチン、 β -クリプトキサンチン及び β -カロテンの標準品を、それぞれ高速液体クロマトグラフィーで分析した結果である。図2の結果から、本発明の遺伝子によりコードされる β -カロテンハイドロキシラーゼは、エルビニア菌や海洋細菌など公知の遺伝子Crt Zとよりコードされる公知の β -カロテンハイドロキシラーゼとは異なり、 β -クリプトキサンチンを主に生成し、ゼアキサンチンを少量しか生成しないように触媒するものであることがわかる(図2中段)。

【0035】

【発明の効果】本発明により、 β -カロテンハイドロキ

*シラーゼ、 β -カロテンハイドロキシラーゼをコードするDNA、当該DNAを含む組換えベクター、当該ベクターによって形質転換された形質転換体並びに β -カロテンハイドロキシラーゼ及び β -クリプトキサンチンの製造方法が提供される。本発明の β -カロテンハイドロキシラーゼは、カンキツ果実およびその加工品の品質及び機能を保つために必要かつ重要な物質である色素(β -クリプトキサンチン)の生成を触媒する点で有用である。

10 【0036】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：1158

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Citrus unshiu

20 配列の特徴

特徴を表わす記号：CDS

存在位置：87..1019

配列

CCACAATCCA	CTTCACATCA	ACTCTTCCTC	TTTCAAGTG	CTTTTACTCT	AAAACCCAAA	60
ACCTCGTAAA	CAAACAAAC	CCCACC	ATG GCG	GTC GGA CTA TTG	GCC ATA	113
Met Ala Val Gly Leu Leu Ala Ala Ile						
1	5					
GTC CCG AAG CCC TTC TGT	CTC CTC ACA ACA AAA	CTT CAA CCC TCT	TCG			161
Val Pro Lys Pro Phe Cys	Leu Leu Thr Thr Lys	Leu Gln Pro Ser Ser				
10	15	20	25			
CTC CTC ACA ACA AAA CCC GCT	CCC CTT TTT CCC CCT	CTC GGT ACC CAC				209
Leu Leu Thr Thr Lys Pro Ala	Pro Leu Phe Ala Pro	Leu Gly Thr His				
30	35	40				
CAT GCC TTC TTT AAT CCC AAA AAC CGA AGA AAA	CTC AAC TCT TTC ACC					257
His Gly Phe Phe Asn Gly Lys Asn Arg Arg Lys	Leu Asn Ser Phe Thr					
45	50	55				
GTA TGT TTT GTT TTA GAG GAG AAA AAA CAA ACC	ACC CAG ATC GAG ACT					305
Val Cys Phe Val Leu Glu Glu Lys Lys Gln Ser Thr	Gln Gln Ile Glu Thr					
60	65	70				
TTC ACG GAC GAG GAG GAG TCG GGT ACC CAG ATC	TCG ACT CCT					353
Phe Thr Asp Glu Glu Glu Ser Gly Thr Gln Ile Ser	Thr Ala					
75	80	85				
CCC CCC GTG GCC GAG AAA TTG CCG AGA AAG AGA	TCC GAG AGG TTC ACT					401
Ala Arg Val Ala Glu Lys Leu Ala Arg Lys Arg Ser	Glu Arg Phe Thr					
90	95	100	105			
TAT CTC GTT GCT GCC GTC ATG TCT AGT TTT CGT	ATC ACT TCC ATG CCT					449
Tyr Leu Val Ala Ala Val Met Ser Ser Phe Gly	Ile Thr Ser Met Ala					
110	115	120				
GTC ATG GCT GTT TAT TAC AGG TTC TGG TCG CAA	ATG GAG GGT GGA GAG					497
Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg Phe Trp Trp Gln Met	Glu Gly Glu					

(8)			特開平11-155577
13	14		
125	130	135	
GTG CCT TTA GCT GAA ATG TTT GCC ACA TTT CCT CTC TCT GTT GGT CCT			545
Val Pro Leu Ala Glu Met Phe Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala			
140	145	150	
GCT GTG GCC ATG GAG TTT TCG CCA CGA TGG CCT CAT AAA CCT CTG TGG			593
Ala Val Gly Met Glu Phe Trp Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp			
155	160	165	
CAT CCT TCT TTA TGG CAT ATG CAC GAG TCT CAC CAT CGA CCA AGA GAG			641
His Ala Ser Leu Trp His Met His Glu Ser His His Arg Pro Arg Glu			
170	175	180	185
GCT CCT TTT GAG CTA AAC GAT GTG TTT GCC ATA ATC AAC GCA GTT CCA			689
Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala Ile Ile Asn Ala Val Pro			
190	195	200	
GCC ATA GCC CTT CTC TCT TTT GGC TTC CAC AAA GGC CTT GTA CCT			737
Ala Ile Ala Leu Leu Ser Phe Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Val Pro			
205	210	215	
GCT CTC TCC TTT GGT CCT GGA CTT GGC ATT ACG GTG TTT GGG ATG CCC			785
Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala			
220	225	230	
TAC ATG TTC GTC CAC CAT GGT CTC GTT CAC AAA AGG TTC CCT GTG GGT			833
Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly			
235	240	245	
CCC ATT GCC GAC GTG CCT TAT TTC CGG AGA GTC GCT GCG GCT CAC CAG			881
Pro Ile Ala Asp Val Pro Tyr Phe Arg Arg Val Ala Ala Ala His Gln			
250	255	260	265
CTT CAC CAC TCG GAT AAA TTC CAC GGT GTT CCA TAT GGG CTC TTT CTC			929
Leu His His Ser Asp Lys Phe His Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Leu			
270	275	280	
CGA CCT AAG GAG CTT GAA GAA GTG GGG GGA CTA GAA GAA TTG GAG AAG			977
Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu Val Gly Gly Leu Glu Glu Leu Glu Lys			
285	290	295	
CAG ATC AGT AAG AGA ATC AAA TCA TAC AAC AGG GTT CCA AAA			1019
Glu Ile Ser Lys Arg Ile Lys Ser Tyr Asn Arg Val Pro Lys			
300	305	310	
TAATCAATTG AATGGGAGGA CCAATTGTTG GATCAATTG TCAGTGACA GAAACAATAG			1079
TGTTATTAAAT GAAAAAAATA AATTATGAAT CCTTATGGT GGATTACTGT TCTAAAGTT			1139
ATGATGTTAA ATAATATAT			1158

【0037】配列番号：2

配列の長さ：311

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

* 40

配列

Met	Ala	Val	Gly	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Pro	Lys	Pro	Phe	Cys	Leu	
1	5	10	15												
Leu	Thr	Thr	Lys	Leu	Gln	Pro	Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ala
20	25	30													
Pro	Leu	Phe	Ala	Pro	Leu	Gly	Thr	His	His	Gly	Phe	Phe	Asn	Gly	Lys
35	40	45													
Asn	Arg	Arg	Lys	Leu	Asn	Ser	Phe	Thr	Val	Cys	Phe	Val	Leu	Glu	Glu
50	55	60													
Lys	Lys	Gln	Ser	Thr	Gln	Ile	Glu	Thr	Phe	Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	

(9)

特開平1 1 - 1 5 5 5 7 7

15

16

65	70	75	80
Glu Ser Gly Thr Gln Ile Ser Thr Ala Ala Arg Val Ala Glu Lys Leu			
85	90	95	
Ala Arg Lys Arg Ser Glu Arg Phe Thr Tyr Leu Val Ala Ala Val Met			
100	105	110	
Ser Ser Phe Gly Ile Thr Ser Met Ala Val Met Ala Val Tyr Tyr Arg			
115	120	125	
Phe Trp Trp Gln Met Glu Gly Glu Val Pro Leu Ala Glu Met Phe			
130	135	140	
Gly Thr Phe Ala Leu Ser Val Gly Ala Ala Val Gly Met Glu Phe Trp			
145	150	155	160
Ala Arg Trp Ala His Lys Ala Leu Trp His Ala Ser Leu Trp His Met			
165	170	175	
His Glu Ser His His Arg Pro Arg Glu Gly Pro Phe Glu Leu Asn Asp			
180	185	190	
Val Phe Ala Ile Ile Asn Ala Val Pro Ala Ile Ala Leu Leu Ser Phe			
195	200	205	
Gly Phe Phe His Lys Gly Leu Val Pro Gly Leu Cys Phe Gly Ala Gly			
210	215	220	
Leu Gly Ile Thr Val Phe Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly			
225	230	235	240
Leu Val His Lys Arg Phe Pro Val Gly Pro Ile Ala Asp Val Pro Tyr			
245	250	255	
Phe Arg Arg Val Ala Ala Ala His Gln Leu His His Ser Asp Lys Phe			
260	265	270	
His Gly Val Pro Tyr Gly Leu Phe Leu Gly Pro Lys Glu Leu Glu Glu			
275	280	285	
Val Gly Gly Leu Glu Glu Leu Glu Lys Glu Ile Ser Lys Arg Ile Lys			
290	295	300	
Ser Tyr Asn Arg Val Pro Lys			
305	310		

【0000】配列番号：3

*

配列

His Asp Gly Leu Val His

1 5

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Phe Glu Leu Asn Asp Val Phe Ala

1 5

【0038】配列番号：4

40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の長さ：6

配列の特徴

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

TTYGARCTAA AYGAYGTN

18

【0040】配列番号：6

トポロジー：直鎖状

配列の長さ：17

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の型：核酸

配列の特徴

鎖の数：一本鎖

50

17

18

配列

CACCGAYGGTC TNGTNCA

【0041】配列番号：7

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

AACTGGAAACA ATTCCGGGCC GCACGAA

【0042】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

TCCGAAGAATT CGCCGGCCGCA G

【図面の簡単な説明】

【図1】カロテノイド類の生合成系を示す図である。

【図2】高速液体クロマトグラフィーの結果を示す図で★

＊トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

＊

17

※トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴

※

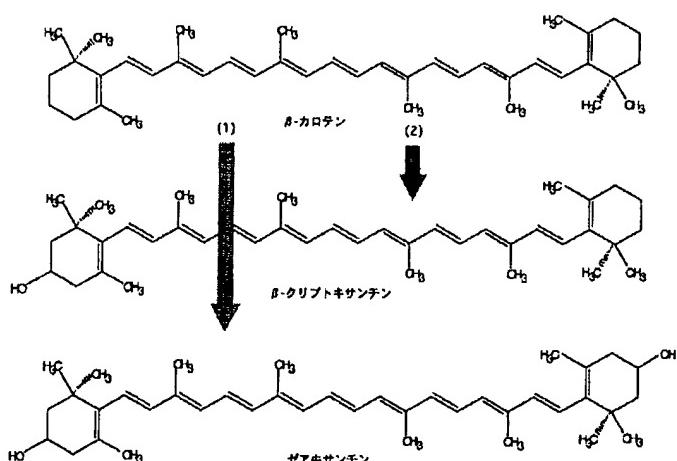
27

★ある。

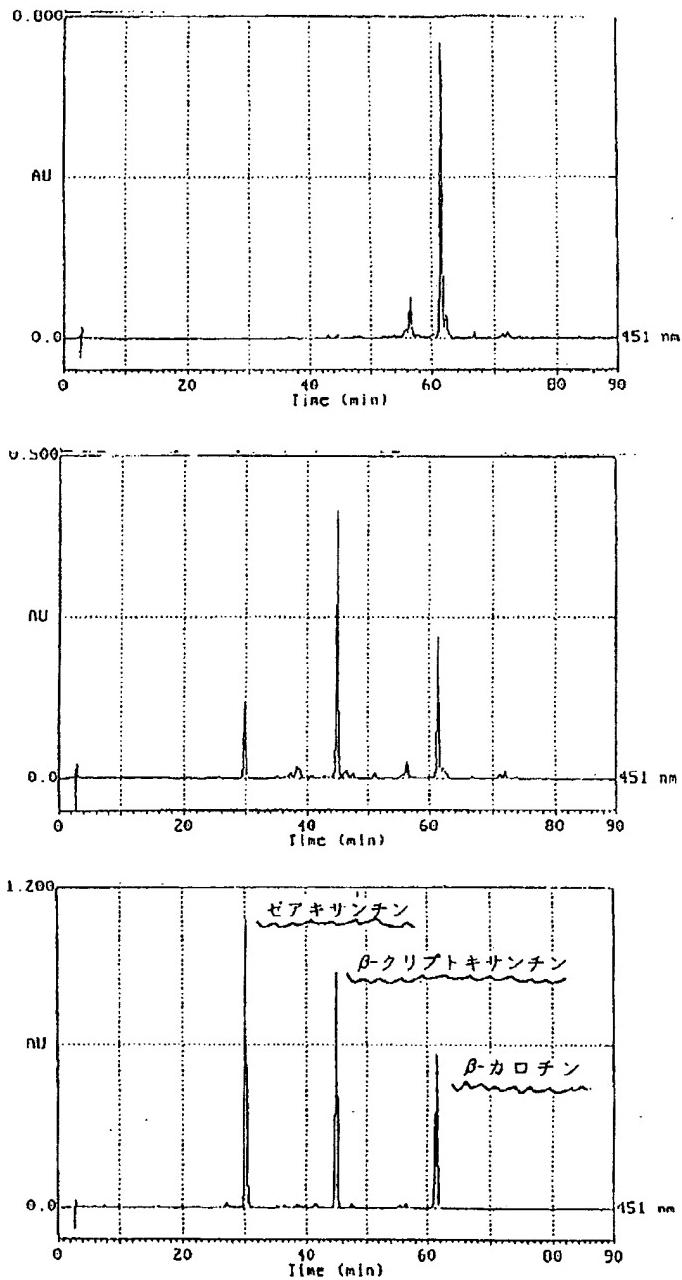
【図3】 β -カロテンハイドロキシラーゼと他の酵素と

の間でアミノ酸配列のホモロジーを比較した図である。

【図1】



【図2】



[図3]

フロントページの続き

(51) Int.C1.⁶
C 1 2 R 1:91
(C 1 2 N 1/21)

C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 N 9/04
C 1 2 R 1:19)
(C 1 2 P 23/00
C 1 2 R 1:19)

(72)発明者 生駒 吉誠
静岡県清水市折戸1-20-1 合同宿舎三
保第1住宅1-33

(72)発明者 小松 晃
静岡県清水市興津中町1126-2-303

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADING TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.